

Serum adiponectin und progranulin levels are associated with gallstone disease

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von: Ruth Sandvoß, geb. Völkl

Geburtsdatum: 12.02.1977

Geburtsort: Eichstätt

angefertigt an der Klinik und Poliklinik für Endokrinologie und Nephrologie der Universität
Leipzig

Betreuer: PD Dr. Anke Tönjes und Dr. rer. nat. Jana Breinfeld

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 12.12.2017

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung in die Thematik.....	2
1.1 Epidemiologie.....	2
1.2 Pathophysiologie.....	2
1.2.1 Cholesterolsteine.....	2
1.2.2 Pigmentsteine.....	4
1.3 Adipozytokine.....	5
1.3.1 Adiponectin.....	5
1.3.2 Progranulin.....	6
1.3.3 Chemerin.....	6
1.3.4 Vaspin.....	7
1.3.5 FGF21.....	7
1.3.6 AFABP.....	8
1.4 Zielstellung.....	9
2. Publikation.....	10
3. Zusammenfassung der Arbeit.....	16
4. Literaturverzeichnis.....	19
5. Anlagen.....	27
5.1 Erklärung über den wissenschaftlichen Beitrag.....	27
5.2 Selbständigkeitserklärung.....	28
5.3 Lebenslauf.....	29
5.4 Danksagung.....	30

1. Einführung in die Thematik

1.1 Epidemiologie

Die Prävalenz des Gallensteinleidens in den Europäischen Industrieländern beträgt für Erwachsene 10-15% (1, 2). Die Kosten, die mit Diagnosestellung und Behandlung von Komplikationen wie z.B. Cholezystitis, Cholangitis oder Pankreatitis verbunden sind, sind enorm. In Deutschland werden jährlich etwa 190 000 Cholezystektomien durchgeführt (3). In den USA beispielsweise entstehen jährliche Kosten von 6,5 Milliarden US-Dollar (4).

1.2 Pathophysiologie

Die Pathophysiologie der Gallensteinentstehung ist noch nicht vollständig geklärt.

Einige nachgewiesene Risikofaktoren sind Alter, weibliches Geschlecht und die Einnahme bestimmter Medikamente (4). Weitere sind Diabetes mellitus, Insulinresistenz und eine kohlenhydratreiche Ernährung mit einem hohen glykämischen Index (5, 6). Aufgrund der vorliegenden epidemiologischen Daten kann die Cholelithiasis als eine Komponente des metabolischen Syndroms angesehen werden (7).

Mäuse, denen der hepatische Insulinrezeptor fehlt, weisen eine Gallenflüssigkeit auf, die mit Cholesterol übersättigt ist (8). Man vermutet dahinter die fehlende Inhibition des Transkriptionsfaktors FoxO1 (Forkhead box protein O1), welche wiederum mit einer erhöhten Expression des Transporters *ABCG5/ABCG8* (ATP-binding cassette sub-family G member 5/ ATP-binding cassette sub-family G member 8) und damit mit einer erhöhten Sekretion von Cholesterol in die Gallenflüssigkeit einhergeht (8). Somit könnten die hepatische Insulinresistenz und der Transkriptionsfaktor FoxO1 einen Link zwischen dem metabolischen Syndrom und der Bildung von Gallensteinen darstellen (9).

Für die Adipokine Adiponectin, Visfatin, Leptin und das Retinolbindende Protein 4 konnte mittlerweile eine Assoziation mit dem Auftreten von Gallensteinen belegt werden (10-13).

1.2.1. Cholesterolsteine

In der menschlichen Gallenblase finden sich drei Typen von Gallensteinen: reine Cholesterolsteine, reine Pigmentsteine und gemischte Steine.

Die Entstehung von Cholesterolsteinen ist multifaktoriell. Ihr liegt ein komplexes Zusammenspiel von Umwelt- und genetischen Faktoren zugrunde. In westlichen Zivilisationen finden sich nach Cholezystektomie in 80-90% der Fälle Cholesterolsteine in der Gallenblase (2). In einer Studie an 1025 Personen aus Norddeutschland, wurden die entnommenen Steine spektrometrisch untersucht. Bei 95% der adipösen Probanden (Body-Mass-Index, BMI >30kg/m²) fand sich Cholesterol als dominierende Substanz in den Steinen. Nur 2% der Steine waren Pigmentsteine (14).

Cholesterol ist in wässrigen Medien schlecht löslich. Gallensäuren und Phospholipide fungieren als Lösungsvermittler, indem sie mit Cholesterol Mizellen bilden (15). Von den Leberzellen werden Phospholipid-Cholesterol-Vesikel in das Gallenwegsystem abgegeben und während ihres weiteren Transports durch Gallensäuren, die in Form von einfachen Mizellen vorliegen, in gemischte Gallensäuren-Phospholipid-Cholesterol-Mizellen umgewandelt. Dadurch bleiben Cholesterol und Phospholipide stabil in Lösung (16). Ausgangspunkt der Bildung von Cholesterolsteinen ist eine mit Cholesterol übersättigte Galle („lithogene Galle“). Hier gelingt die Umwandlung in solche gemischten Mizellen wegen des relativen Gallensäuremangels nur unvollständig. Der Cholesterolanteil der Vesikel nimmt zu, die Stabilität entsprechend ab. Als Folge lagern sich die Vesikel aneinander, können zu größeren unilamellären Vesikeln verschmelzen und multilamelläre Formen ausbilden. Mit diesen Vorgängen ist die Voraussetzung für das Ausfällen von Cholesterolkristallen gegeben (17).

Die Übersättigung der Galle mit Cholesterol ist zwar essentiell für die Steinbildung, aber alleine nicht ausreichend. Auch unter physiologischen Bedingungen kommt es zu sättigenden Cholesterolkonzentrationen. Die daraus resultierenden Mikrokristalle werden normalerweise durch die physiologische postprandiale Kontraktion der Gallenblase ins Duodenum befördert. Zur Steinbildung kommt es durch eine gestörte Gallenblasenmotilität oder ein Ungleichgewicht zwischen steinfördernden und steinhemmenden Faktoren (15).

Im Wesentlichen wird der Grad der Sättigung durch das Konzentrationsverhältnis von Phospholipiden und Gallensäuren auf der einen Seite und Cholesterol auf der anderen Seite bestimmt(18)(19). Je nach prozentualem Anteil der drei Komponenten liegen unterschiedliche Zonen vor. Die physiologische Einphasenzone, in der Cholesterol in stabilen Mizellen vorliegt und drei Zonen, wenn eine Übersättigung der Galle vorliegt: zwei Zweiphasenzonen, die Mizellen und Vesikel bzw. Mizellen und Cholesterolkristalle enthalten und eine zentrale Dreiphasenzone, in der Mizellen, Vesikel und Kristalle vorkommen. Entsprechend dieses Schemas ist Galle von Gallensteinträgern in der blauen und orangen Zone einzuordnen (15) (Abb. 1).

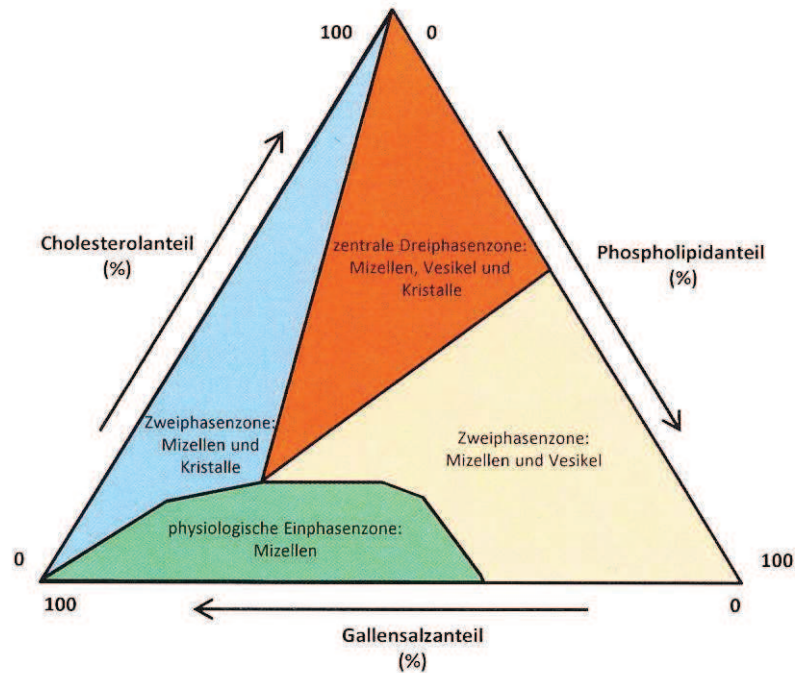


Abb. 1: Schematische Darstellung der Cholesteroltransportformen in Abhängigkeit von den prozentualen Anteilen von Cholesterol, Phospholipiden und Gallensalzen in der Galle. Modifiziert nach Wang und Carey (19).

1.2.2 Pigmentsteine

Pigmentgallensteine bestehen vorwiegend aus Kalziumbilirubinen und unterschiedlich großen Mengen an Proteinen und Cholesterol. Bakterielle oder parasitäre Infektionen der Gallengänge begünstigen die Entstehung brauner Pigmentsteine durch die Produktion von Enzymen wie z.B. der beta-Glucuronidase, welche zu erhöhten Konzentrationen von unkonjugiertem Bilirubin führen mit dem Resultat, dass durch Komplexbildung mit Kalzium Steine gebildet werden (zusammengefasst in (20)).

Braune Steine bilden sich v.a. im Ductus hepaticus communis, seltener in den intrahepatischen Gallengängen in entzündlich veränderter Gallenflüssigkeit, während schwarze Pigmentsteine in steriler Gallenflüssigkeit entstehen (21).

Im Zentrum der Pathogenese von Pigmentgallensteinen steht der vermehrte Anfall von Kalziumbilirubinen. Ein Grund dafür kann eine verringerte Glucuronidierung von Bilirubin sein, z.B. bei Leberzirrhose, oder aber eine erhöhte Sekretion von Bilirubin in die Galle. Als Ursache ist hier beispielsweise eine vermehrte Bilirubinproduktion im Rahmen einer Hämolyse oder eine Gallensalzmalabsorption z.B. bei Morbus Crohn zu nennen (22). Aufgrund der wesentlich geringeren Häufigkeit spielen die Pigmentgallensteine eine untergeordnete Rolle.

1.3 Adipozytokine

Das Fettgewebe fungiert nicht nur als Fettdepot im Sinne eines Energiespeichers, sondern sezerniert auch verschiedene Proteine mit hormonähnlicher Wirkung und wirkt somit als „endokrines Organ“. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl dieser Proteine entdeckt, welche allgemein als Adipozytokine oder Adipokine bezeichnet werden (zusammengefasst in (23)). Vor allem durch die nachgewiesenen Zusammenhänge mit Adipositas und den damit assoziierten Erkrankungen erlangten Adipokine große Bedeutung und stellen teilweise bereits neue Therapieansätze dar.

1.3.1 Adiponectin

Adiponectin gehört zu den am umfangreichsten untersuchten Adipokinen. Das Protein mit einer Größe von 30kDa wurde 1995 erstmals beschrieben. Bedeutung erlangte Adiponectin v. a. durch die Erkenntnis, dass es im Gegensatz zu den anderen bisher bekannten Adipokinen insulinsensitivierende Wirkung aufweist. Die verbesserte Insulinempfindlichkeit konnte in Geweben wie Leber, Muskulatur und Fett beobachtet werden (24, 25). Darüber hinaus wird durch dieses Protein die Ausbildung arteriosklerotischer Gefäßwandveränderungen unterdrückt. Durch Studien an Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Intima der Gefäße von Mäusen, bei denen das *Adiponectin*-Gen ausgeschaltet wurde, signifikant dicker war als bei den Kontrolltieren mit intaktem *Adiponectin*-Gen (26, 27). Am Herz hat Adiponectin einen protektiven Effekt und bewirkt in einem Reperusionsmodell eine Abnahme der Myokardinfarktausdehnung (28).

Viele Studien weisen ein vermindertes Vorkommen von Adiponectin im Serum und Fettgewebe bei Adipositas und Insulinresistenz nach (29, 30). Dementsprechend kommt es durch Gewichtsreduktion zu einer Erhöhung der Adiponectinkonzentration (31, 32). Auch weitere Änderungen im Lebensstil wie Ernährungsumstellung und vermehrte körperliche Aktivität führen zu erhöhten Adiponectinspiegeln (33, 34). Bei Frauen mit metabolischem Syndrom fand sich eine negative Korrelation mit dem Bauchumfang (35).

Adiponectin wurde bereits auf mögliche Zusammenhänge mit dem Auftreten von Gallensteinen hin untersucht. In Patienten mit Gallensteinen und einem BMI $\geq 25\text{kg/m}^2$ war der Serumadiponectinspiegel signifikant erniedrigt (36). Konsistent dazu war in einem Mausmodell, in dem das *Adiponectin*-Gen ausgeschaltet wurde, die Prävalenz von Gallensteinen bei diesen Knockout-Mäusen nach einer lithogenen Diät signifikant höher als bei den Kontrolltieren. Nach histologischer Aufarbeitung stellte sich die Gallenblasenwand verdickt dar und es fand sich eine hohe Anreicherung von Glycoproteinen in der Gallenblase (37).

1.3.2 Progranulin

Progranulin, auch als *granulin-epithelin-precursor*, *proepithelin*, *prostate cancer cell derived growth factor* oder *acrogranin* bekannt, ist ein multifunktionales Protein, das mit einem Molekulargewicht von 90kDa sezerniert wird (zusammengefasst in (38)).

Mutationen im *Progranulin*-Gen werden für die Entstehung der frontotemporalen Demenz mit verantwortlich gemacht (zusammengefasst in (39)).

Es besteht eine Assoziation von erhöhten Progranulin-Spiegeln mit Diabetes mellitus Typ 2, erhöhtem viszeralem Fettanteil und verstärkter Makrophageninfiltration ins Fettgewebe (42). Außerdem fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhtem CRP (C-reaktives Protein) und der Progranulinkonzentration im Serum, so dass Progranulin möglicherweise als Marker für den chronischen Entzündungszustand, welcher mit viszeraler Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 beim Menschen assoziiert ist, angesehen werden kann (42).

Vor kurzem wurde Progranulin als Wachstumsfaktor beschrieben, der die Proliferation von Cholangiozyten anregt und möglicherweise eine Rolle in der Pathogenese des Cholangiokarzinoms spielt (44-46). Außerdem wurde gezeigt, dass vermutlich über den HNF1alpha/FXR-Weg (hepatic nuclear factor 1alpha/ Farnesoid X Rezeptor), eine Deletion von Sirtuin 1 (*SIRT1*) in Hepatozyten mit einem erhöhten Gallensteinrisiko in Mäusen einhergeht (47). Allerdings ist unklar inwiefern Serumprogranulinkonzentrationen mit den Progranulinspiegeln in den Gallenwegen in Beziehung stehen und warum hier geschlechtsspezifische Unterschiede vorliegen.

1.3.3 Chemerin

Chemerin wird auch *retinoic acid receptor responder protein 2 (RARRES2)* genannt, als inaktive Form (Prochemerin) sezerniert und letztendlich durch Serinproteasen in seine aktive Form umgewandelt (48).

Chemerin wurde ursprünglich als ein Chemokin beschrieben, welches bei entzündlichen Prozessen in Körperflüssigkeiten nachweisbar ist und in die Chemotaxis und Aktivierung von Makrophagen und dendritischen Zellen involviert ist (49).

Nach dem Nachweis von mRNA (messenger-RNA) in Fettzellen wurde Chemerin erstmals als Adipokin bezeichnet. Die Genexpression für dieses Protein im Fettgewebe adipöser Ratten und Ratten mit Diabetes mellitus Typ 2 war signifikant höher als die im Fettgewebe normgewichtiger und normoglykämischer Kontrolltiere. Für den Menschen konnte gezeigt werden, dass der Serumspiegel von Chemerin signifikant mit BMI, Plasmatriglyzeriden, diastolischem und systolischem Blutdruck und weiteren Komponenten des metabolischen Syndroms assoziiert ist (50).

Diverse Studien zeigen einen Zusammenhang von erhöhten Serumchemerinspiegeln mit einer Insulinresistenz im Skelettmuskel bzw. einer subklinischen Entzündungsreaktion im Fettgewebe (51-53).

Chemerin fungiert damit als Chemokin, welches die Funktion des Immunsystems moduliert und als Adipokin, das in adipösen Individuen und solchen mit Diabetes mellitus Typ 2 signifikant höher nachweisbar ist als in normgewichtigen Personen. Es fand sich eine positive Korrelation des Chemerinserumspiegels mit einem erhöhten CRP bei Diabetikern (54).

Die Rolle von Chemerin in der Pathogenese von Gallensteinen ist bislang unklar.

1.3.4 Vaspin

Vaspin steht für *visceral adipose tissue derived serine protease inhibitor*. Es gehört zur Familie der Serinproteaseinhibitoren. Der Nachweis gelang aus dem viszeralen Fettgewebe von *Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats* (OLETF). Bei einer zunehmenden diabetischen Stoffwechsellage als auch bei einer Gewichtsabnahme wurde eine Verringerung der Serumvaspinspiegel beobachtet, während durch Insulingabe oder Verabreichung von Pioglitazonen, als Insulinsensitizer, eine Normalisierung der Serumvaspinspiegel gelang. In einem Mausmodell führte die Gabe von rekombinantem humanem Vaspin zu einer verbesserten Glucosetoleranz und Insulinsensitivität (55). Für den Menschen konnte in einigen Studien eine Assoziation von erhöhten Serumvaspinspiegeln mit dem BMI und abnehmender Insulinsensitivität gezeigt werden (56, 57). Widersprüchliche Daten fanden sich dagegen bei von Loeffelholz et al. (58), die keine signifikante Assoziation von Serumvaspinspiegel und Insulinsensitivität für Nichtdiabetiker belegen konnten.

Eine durch Lebensstiländerung, Pharmakotherapie oder bariatrische Eingriffe hervorgerufene Gewichtsabnahme verringerte die Serumvaspinkonzentrationen (12, 59). Kim et al. (60) hingegen konnten dokumentieren, dass ein 10-monatiges Programm zur Änderung der Lebensweise zwar zu einer signifikanten Verbesserung metabolischer Parameter wie Blutdruck oder Gesamtcholesterol im Serum bzw. Anstieg des Adiponectinspiegels führte, die Vaspinkonzentration aber unbeeinflusst blieb.

Zum aktuellen Zeitpunkt existieren noch keine Daten bezüglich des Zusammenhangs zwischen Vaspin und der Bildung von Gallensteinen.

1.3.5 FGF21

FGF21, ein aus 210 Aminosäuren bestehendes Polypeptid aus der Familie der *human fibroblast growth factors* wird v. a. in der Leber exprimiert und konnte in Tiermodellen als wichtiger Regulator im Glucose- und Lipidstoffwechsel identifiziert werden (61-63). Es hat

einen antihyperglykämischen und insulinsensitivierenden Effekt. Nach Inkubation mit FGF21 war in Inselzellen von Ratten mit Diabetes ein erhöhter Insulingehalt und eine vermehrte glucoseinduzierte Insulinsekretion nachweisbar (64).

Die Behandlung von diabetischen Mäusen mit rekombinantem FGF21 führte zu einem Abfall der Plasmaglukose und -triglyceride auf nahezu Normwerte (62).

Auch für den Menschen wurde mittlerweile die Rolle von FGF21 auf den Stoffwechsel der Leber und sein insulinsensitivierender Effekt deutlich (zusammengefasst in (65)). Patienten, sowohl mit Adipositas als auch mit Diabetes mellitus Typ 2, wiesen signifikant höhere Serumkonzentrationen auf als die gesunde Kontrollgruppe (66, 67). Zhang et al. fanden erhöhte FGF21-Spiegel in adipösen Patienten und solchen mit metabolischem Syndrom (68). Bei Diabetikern führte die Einnahme von Fibraten zu signifikant höheren FGF21-Konzentrationen im Vergleich zu Diabetikern ohne Fibrateinnahme (69). Die Infusion von Lipiden und eine künstlich hervorgerufene Hyperinsulinämie bewirkten eine Zunahme des zirkulierenden FGF21 (70).

Neben der Leber sind auch die Skelettmuskulatur und das Fettgewebe wichtige Orte der FGF21-Produktion (72, 73).

Bislang gibt es noch keine Untersuchungen zur Assoziation von FGF21 mit der Cholelithiasis.

1.3.6 AFABP

Das *adipocyte fatty acid binding protein*, auch bekannt als aP2 oder FABP4, ist ein kleines lipidbindendes Protein, das sowohl in Makrophagen als auch in Adipozyten exprimiert wird (74, 75). Es gehört zu den am höchsten exprimierten zytoplasmatischen Proteinen in Adipozyten (76), wovon ein erheblicher Anteil sezerniert wird (74). Studien haben gezeigt, dass Mäuse, bei denen das AFABP-Gen ausgeschaltet wurde, vor der Ausbildung von adipositasinduzierter Insulinresistenz, verminderter Glucosetoleranz und Arteriosklerose geschützt sind (77, 78).

Die AFABP-Serumspiegel waren in übergewichtigen und adipösen Probanden im Vergleich zur normgewichtigen Kontrollgruppen signifikant höher und zeigten eine positive Korrelation mit Bauchumfang, Blutdruck, Dyslipidämie und Insulinresistenz (74). Die Assoziation mit Komponenten des metabolischen Syndroms und Typ 2 Diabetes konnte in weiteren Studien bestätigt werden (79, 80, 81). Außerdem korrelierten die AFABP-Serumspiegel positiv mit der Intima-Media-Dicke der Arteria carotis interna in 479 chinesischen Probanden (82).

Schwangere Frauen mit Gestationsdiabetes und Präeklampsie wiesen signifikant erhöhte AFABP-Konzentrationen im Serum auf (83, 84).

Eine weitere Assoziation findet sich mit der nichtalkoholischen Steatosis hepatis bei Diabetes mellitus Typ 2. Zirkulierendes AFABP ist möglicherweise an der Pathogenese der Fettleber beteiligt (85, 86).

Diese Ergebnisse zeigen die Bedeutung von AFABP im Zusammenhang mit dem metabolischen Syndrom und den damit verbundenen kardiovaskulären Begleiterscheinungen. Die Rolle bei der Entstehung von Gallensteinen ist bislang jedoch noch nicht geklärt.

1.4 Zielstellung

Gallensteine stellen ein erhebliches gesundheitsökonomisches Problem dar. Komplikationen wie Entzündungen, Cholestase oder Pankreatitis führen zu steigenden Hospitalisierungsraten (87).

Für die Pathogenese von Gallensteinen sind einige Risikofaktoren wie z.B. Alter, Geschlecht oder Einnahme bestimmter Medikamente bekannt (4). Wie auch für kardiovaskuläre Erkrankungen besteht für das Gallensteinleiden eine Assoziation mit dem metabolischen Syndrom (7, 88). Die bekannten Faktoren erklären jedoch nur einen Teil des Risikos, an einer Cholelithiasis zu erkranken. Zusätzlich könnte ein unterschiedliches Adipokinprofil zur Pathogenese beitragen.

Es existieren Daten aus Tiermodellen und aus klinischen Studien, die für einige Adipokine wie Adiponectin, Visfatin, Leptin oder das Retinolbindende Protein 4 einen Zusammenhang zwischen Serumspiegel und der Entstehung von Gallensteinen zeigen (10-13, 89).

Ziel dieser Arbeit war die Auswertung einer Studie mit 1022 Probanden (189 Gallensteinträger, 833 gallensteinfreie Probanden) um zu prüfen, ob eine Assoziation des Gallensteinleidens mit Adiponectin-, Chemerin-, Vaspin-, Progranulin-, FGF21- und AFABP-Serumspiegeln vorliegt.

2. Publikation

Titel: Serum adiponectin and progranulin levels are associated with gallstone disease

Autoren: Jana Breitfeld*, Ruth Sandvoß*, Dorit Schleinitz, Yvonne Böttcher, Mathias Faßhauer, Matthias Blüher, Michael Stumvoll, Peter Kovacs, Henning Wittenburg, Anke Tönjes

(*geteilte Erstautorenschaft)

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden im folgenden Fachjournal publiziert:

Journal: Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes

Veröffentlichungsdatum: November 2014

Serum Adiponectin and Progranulin Levels are Associated with Gallstone Disease

Authors

J. Breitfeld^{1*}, R. Sandvoss^{2*}, D. Schleinitz¹, Y. Böttcher¹, M. Fasshauer^{1,2}, M. Blüher^{1,2}, M. Stumvoll^{1,2}, P. Kovacs¹, H. Wittenburg³, A. Tönjes²

Affiliations

¹ IFB Adiposity Diseases, University of Leipzig, Leipzig, Germany

² Department of Medicine, Division of Endocrinology and Nephrology, University of Leipzig, Leipzig, Germany

³ Department of Medicine, Division of Gastroenterology, University of Leipzig, Leipzig, Germany

Key words

- gallstones
- adipokines
- gallbladder
- obesity
- diabetes

Abstract

Background/Aim: Aberrant adipokine serum concentrations are associated with a variety of obesity-related diseases. This study was designed to investigate the putative role of the adipokines adiponectin, chemerin, progranulin, vaspin, fibroblast growth factor 21 (FGF21) and adipocyte fatty acid binding protein (AFABP) in gallstone disease.

Methods: Serum levels of adiponectin, chemerin, progranulin, vaspin, FGF21 and AFABP of 189 gallstone patients and 833 healthy controls were measured by enzyme-linked immunosorbent assays.

Results: Increased adiponectin levels were nominally associated with lower gallstone risk in

women ($p=0.036$, odds ratio (OR) 0.47, 95% confidence interval (CI) [0.23; 0.95]). Furthermore progranulin serum concentrations in men were significantly elevated in gallstone carriers in comparison to controls ($p=0.012$, OR 6.1, 95% CI [1.5; 24.9]). Serum levels of chemerin, vaspin, FGF21 and AFABP did not differ between controls and subjects with gallstones.

Conclusion: Our data further support a protective effect of adiponectin on gallstone risk and suggest a role of progranulin in the pathophysiology of cholelithiasis. Nevertheless, longitudinal data and functional analyses would be required to assess the pathogenetic link between gallstone formation and adipokine serum levels.

Introduction

Gallstones are common in Western countries with a prevalence of 10–15% in adults [1] and complications of cholelithiasis generate high costs for health care systems [2–5]. The pathophysiology of gallstone formation is still not fully understood. However, the incidence of cholelithiasis appears to be linked to the rising prevalence of obesity and type 2 diabetes (T2D) [6,7]. In principle, there are 3 types of gallstones: cholesterol and pigment gallstones which usually form in the gallbladder and mixed gallstones which are infectious in origin and originate in the bile ducts [8]. In Western countries, cholesterol gallstones account for 80–90% of the gallstones [9]. In a study from northern Germany, >90% of gallstones were confirmed as cholesterol gallstones, whereas only 2% were pigment stones [10].

The risk of gallstone formation is clearly multifactorial and includes a genetic background that comprises numerous lithogenic (*LITH*) genes and their interactions with other risk factors. Some of

the confirmed risk factors for cholelithiasis are age, female sex and certain medications [9]. Other risk factors for gallstones include undiagnosed diabetes, insulin resistance and a diet high in carbohydrates and with a high glycemic load [6,11]. In addition, cholelithiasis is associated with a higher body mass and obesity [12,13], a risk factor that is possibly stronger in women compared with men [14,15]. In addition to obesity, cholelithiasis is caused by rapid weight loss [16] and even moderate weight loss followed by regain (“weight cycling”) [17]. In summary, these epidemiological data suggest that cholelithiasis is yet another feature of the metabolic syndrome and is closely associated with insulin resistance [18]. It is suggested that hepatic insulin resistance and the transcription factor FoxO1 as the link between the metabolic syndrome and gallstone formation [19]. However, it remains elusive how these findings translate to human cholelithiasis and there are likely additional factors that increase the gallstone risk in the metabolic syndrome.

*These authors contributed equally.

received 23.12.2013
first decision 07.04.2014
accepted 06.05.2014

Bibliography

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0034-1376969>
Published online:
July 23, 2014
Exp Clin Endocrinol Diabetes
2014; 122: 559–563
© J. A. Barth Verlag in
Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York
ISSN 0947-7349

Correspondence

A. Tönjes, MD
Department of Medicine
University of Leipzig
Division of Endocrinology and
Nephrology
Liebigstrasse 18
04103 Leipzig
Germany
Tel.: +49/341/97 13380
Fax: +49/341/97 13389
Anke.Toenjes@medizin.uni-leipzig.de

Adipose tissue has emerged as an endocrine organ that produces numerous proteins, collectively referred to as adipokines [20]. Recent data confirmed that aberrant circulating adipokines such as adiponectin [21–23], chemerin [24], progranulin [25], vaspin [26–28], fibroblast growth factor 21 (FGF21) [29] and adipocyte fatty acid binding protein (AFABP) [30] play a crucial role in obesity-related diseases. The association of gallstone formation with obesity suggests that adipokines might influence the lithogenicity of bile and might explain how an increase in fat tissue increases the risk of cholelithiasis. Indeed, data from animal models and from clinical studies demonstrated a relationship of gallstones with several adipokines, especially adiponectin, visfatin, leptin and retinol binding protein 4 (RBP4) [31–37]. For example leptin is a critical cofactor for gallstone formation in ob/ob mice [37]. During pregnancy and the postpartum period serum leptin was independently associated with incidence of gallstones even after adjusting for body mass index (BMI) [38]. However, results are conflicting. In an epidemiological study plasma leptin concentration was associated with gallbladder disease in males and females, but not after controlling for BMI and waist-to-hip ratio [39].

We performed a population based association study for differences in serum levels of adiponectin, chemerin, progranulin, vaspin, FGF21 and AFABP in 1022 subjects with and without gallstones to substantiate the putative role of these adipokines in cholelithiasis.

Methods

Subjects

All subjects were part of a sample from a population from Eastern Germany, the Sorbs [40–42]. A total of 1022 subjects, who all underwent an abdominal ultrasound participated in the present study. 189 subjects (age 61 ± 12 years) were identified as cases with cholelithiasis, among them 114 subjects with prior cholecystectomy and 75 subjects with current gallstones detected by ultrasound. An additional group of 833 subjects (age 45 ± 16 years), including 366 men and 467 women, without detectable gallstones in ultrasound examination was included as the control group (Table 1).

All subjects were extensively phenotyped including BMI, waist and hip circumference and body fat percentage (Table 1). Body fat was measured by body impedance analysis (BIA). BIA was performed with BIA-2000-S (Data Input GmbH, Darmstadt,

Germany) and evaluated with the software Nutri3 (Data Input GmbH). To exclude any secondary effects due to associations with type 2 diabetes mellitus (T2D) the subjects were divided into different subgroups: total cohort ($n=1022$), non-diabetic subjects ($n=892$) and T2D ($n=104$) based on a 75 g oral glucose tolerance test (OGTT) according to the criteria of the American Diabetes Association [43]. 26 subjects were excluded due to the unknown diabetes status. Furthermore, we analysed the subgroup of non-diabetic subjects without treatment with lipid-lowering drugs (116 cases and 693 controls) to exclude any secondary effects associated with these pharmaceuticals.

The ethics committee at the medical faculty of the University of Leipzig approved the study and all subjects provided written informed consent before taking part in the study.

Blood samples and biochemical assays

Blood samples were taken after an overnight fast. They were separated immediately by centrifugation, and serum was stored at -80°C until further analysis. Serum concentrations of all adipokines under investigation (adiponectin, chemerin, FGF21, progranulin, AFABP, vaspin) were determined with a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's instructions (vaspin and progranulin: AdipoGen Inc, Seoul, Korea; FGF21, adiponectin, chemerin and AFABP: BioVendor Inc, Brno, Czech Republic). Serum levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and creatinine (Cr) were determined by standard laboratory procedures.

Insulin sensitivity was determined using homeostasis model assessment of insulin resistance ($\text{HOMA-IR} = \text{fasting insulin } (\mu\text{U/mL}) \times \text{fasting glucose } (\text{mmol/L}) / 22.5$) [44].

Software and statistical analyses

Data are shown as means \pm standard deviation (SD) unless stated otherwise. Before statistical analysis, non-normally distributed parameters were logarithmically transformed to approximate a normal distribution. Differences between 2 groups were assessed by Mann-Whitney-U-test for continuous parameters. Associations with gallstone status were assessed in a logistic regression model with adjustment for age, gender and BMI for each adipokine. Furthermore analyses stratified for gender, T2D and lipid-lowering drugs were performed including age and BMI as covariates.

Statistical analysis was performed using PASW statistics version 20.0.1 (SPSS, Inc.; Chicago, IL).

Table 1 Anthropometric and metabolic parameters stratified for gallstone status.

	Gallstone patients			Control subjects			P-value
	Total	Women	Men	Total	Women	Men	
N	189	144	45	833	467	366	
age (yr)	61 ± 12	60 ± 12	62 ± 12	45 ± 16	45 ± 15	46 ± 16	<0.001
weight (kg)	80.9 ± 15.5	77.8 ± 14.4	90.6 ± 15.1	76.1 ± 14.4	69.9 ± 13.0	84.1 ± 11.9	<0.001
BMI (kg/m^2)	29.9 ± 5.6	30.0 ± 5.9	29.6 ± 4.2	26.2 ± 4.5	25.8 ± 5.0	26.7 ± 3.8	<0.001
waist circumference (cm)	98.4 ± 13.3	96.2 ± 13.3	105.5 ± 10.8	89.2 ± 13.5	84.4 ± 13.0	95.2 ± 11.6	<0.001
body fat (%)	26.7 ± 10.3	28.3 ± 10.6	21.8 ± 7.6	19.9 ± 8.4	22.0 ± 9.1	17.3 ± 6.5	<0.001
ALT ($\mu\text{kat/L}$)	0.46 ± 0.23	0.44 ± 0.23	0.52 ± 0.20	0.43 ± 0.26	0.33 ± 0.18	0.56 ± 0.29	0.007
AST ($\mu\text{kat/L}$)	0.48 ± 0.17	0.47 ± 0.18	0.52 ± 0.12	0.47 ± 0.15	0.42 ± 0.12	0.53 ± 0.16	0.159
Cr ($\mu\text{mol/L}$)	68.1 ± 13.5	64.2 ± 10.2	80.5 ± 15.4	71.6 ± 13.0	64.5 ± 9.4	80.6 ± 10.8	<0.001
HOMA-IR	1.55 ± 0.99	1.58 ± 1.05	1.47 ± 0.79	1.22 ± 0.79	1.21 ± 0.76	1.23 ± 0.84	<0.001

Data are shown as mean \pm standard deviation. BMI = body mass index; ALT = alanine aminotransferase; AST = aspartate aminotransferase; Cr = creatinine, HOMA-IR = homeostasis model of assessment-insulin resistance. P-values are presented for comparison of differences between the total group of gallstone patients and the total group of control subjects assessed by Mann-Whitney-U-Test. For assessment of HOMA-IR only subjects without T2D were included

Results

A total of 1022 subjects (411 men and 611 women) with an age ranging from 18–88 years were studied in groups of gallstone patients and control subjects without detectable gallstones. The anthropometric and metabolic parameters of the study subjects are shown in **Table 1**.

In the multivariate logistic regression model including the total cohort we detected an association between the risk of gallstone formation and age ($p < 0.001$, odds ratio (OR) 1.06, 95% confidence interval (CI) [1.05; 1.08]), female gender ($p < 0.001$, OR 2.86, 95% CI [1.89; 4.17], BMI ($p < 0.001$, OR 1.08, 95% CI 1.04; 1.12]) and T2D ($p = 0.001$, OR 2.19, 95% CI [1.35; 3.54]). No significant association was identified between cholelithiasis and HOMA-IR (**Table 2**).

Serum levels of vaspin, adiponectin, FGF21, chemerin, AFABP and progranulin did not differ between controls and subjects with gallstones in the total cohort of Sorbs (**Table 3**). Additionally, we did not observe an association of the adipokine serum levels with cholelithiasis in the total group of the non-diabetic subjects (data not shown). Likewise, in the subgroup of non-diabetic subjects without treatment with lipid-lowering drugs we did not detect any significant association of serum levels of

vaspin, adiponectin, FGF21, chemerin, AFABP and progranulin with gallstone formation (data not shown).

However, in the gender-stratified analyses higher adiponectin levels were nominally associated with lower gallstone risk in women ($p = 0.036$, OR 0.47, 95% CI [0.23; 0.95], adjusted for age and BMI). Furthermore progranulin serum concentrations in men were significantly elevated in gallstone carriers in comparison to controls ($p = 0.012$, OR 6.1, 95% CI [1.5; 24.9]; adjusted for age and BMI). In contrast, progranulin serum concentrations were associated with a decreased risk for gallstones in women ($p = 0.036$, OR 0.39, 95% CI [0.16; 0.94]; adjusted for age and BMI) (**Table 4**).

Discussion

This study was designed to investigate the role of serum adipokine levels in the pathogenesis of gallstone disease. Gallstone formation is considered to be complex and multifactorial in origin and cholelithiasis is considered to be related to the metabolic syndrome [18,45]. Animal and human data show evidence for a correlation of insulin resistance with organ dysfunction and gallstone disease [7,46]. Recent data derived from an insulin resistant mouse model show that hepatic insulin resistance presents a crucial link between cholesterol gallstone susceptibility and the metabolic syndrome [47]. For numerous adipokines such as adiponectin [48] the association to glucose metabolism and impaired glucose tolerance is well known [27,49–52]. It is reported that altered adipokine levels may contribute to obesity-related diseases [21–26,29,30]. Therefore, we hypothesized a potential association between serum adipokines and risk of gallstone formation. Indeed, in our population we confirmed the association of BMI and T2D with cholelithiasis [6,7,11,15]. However, parameters were not measured longitudinally during stone formation which is a clear limitation of the study.

Adiponectin is a well-known adipokine which attracts a lot of interest because of its insulin-sensitizing effects [53,54]. Accord-

Table 2 Association of anthropometric and metabolic factors with cholelithiasis in the Sorbs cohort.

	OR	95% CI	P-value
age (years)	1.07	1.05; 1.08	<0.001
female gender	2.86	1.89; 4.17	<0.001
weight (kg)	1.03	1.02; 1.04	<0.001
BMI (kg/m ²)	1.09	1.05; 1.13	<0.001
waist (cm)	1.04	1.02; 1.06	<0.001
T2D (y/n)	2.19	1.35; 3.54	0.001
HOMA-IR	0.96	0.74; 1.25	0.757

Risk factors for gallstone disease were assessed by logistic regression analyses. Age, gender and BMI were included as covariates (for weight, BMI and waist only age and gender)

	no of cases/controls	gallstone patients	control subjects	P-value
vaspin (ng/ml)	185/818	0.76 ± 0.79	1.06 ± 1.70	0.993
adiponectin (µg/ml)	177/765	17.2 ± 5.4	16.5 ± 5.5	0.349
FGF21 (ng/ml)	153/605	162.6 ± 273.1	187.0 ± 449.8	0.550
chemerin (ng/ml)	179/798	137.2 ± 42.7	118.7 ± 40.4	0.788
AFABP (ng/ml)	166/784	36.0 ± 23.6	22.2 ± 13.1	0.319
progranulin (ng/ml)	185/824	114.9 ± 30.1	109.8 ± 27.4	0.661

Data are shown as mean ± standard deviation for groups without adjustment. Age, gender and BMI were included as covariates in the logistic regression model

Table 3 Adipokine serum concentrations in individuals with and without cholelithiasis (total cohort).

Table 4 Associations of adipokine concentrations with risk of gallstone disease in the total cohort stratified by gender.

	cases		controls		OR [95% CI]		P-value	
	m/f	m/f	m/f	m/f	univariate m/f	adjusted m/f	univariate m/f	adjusted m/f
vaspin (ng/ml)	45/140	358/460	1.38 [0.99; 1.92]	0.75 [0.62; 0.91]	1.07 [0.73; 1.59]	0.97 [0.77; 1.24]	0.055/0.003	0.721/0.829
adiponectin (+g/ml)	44/133	341/424	2.88 [1.15; 7.21]	0.59 [0.32; 1.10]	1.80 [0.68; 4.76]	0.47 [0.23; 0.95]	0.024/0.096	0.235/0.036
FGF 21 (ng/ml)	37/116	281/324	1.11 [0.83; 1.50]	1.27 [1.02; 1.58]	0.88 [0.62; 1.27]	0.97 [0.74; 1.26]	0.475/0.036	0.499/0.794
chemerin (ng/ml)	44/135	345/453	2.71 [0.95; 7.71]	4.07 [2.22; 7.48]	1.07 [0.37; 3.10]	1.10 [0.54; 2.21]	0.061/<0.001	0.899/0.799
AFABP (ng/ml)	39/127	343/441	3.64 [1.86; 7.12]	4.12 [2.75; 6.19]	1.66 [0.72; 3.85]	1.08 [0.63; 1.86]	<0.001/<0.001	0.236/0.309
progranulin (ng/ml)	45/140	361/463	7.99 [2.10; 30.45]	1.37 [0.67; 2.81]	6.11 [1.50; 24.94]	0.39 [0.16; 0.94]	0.002/0.395	0.012/0.036

m: number of males, f: number of females. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) were assessed in a logistic regression without any adjustment and with age and BMI as covariates. P-values < 0.05 were considered as statistically significant and are presented in bold

ingly it shows decreased plasma levels in type 2 diabetic subjects [21]. Furthermore, adiponectin knockout mice exhibit a greater susceptibility for cholesterol gallstones compared to the controls [35]. Proposed mechanisms include the different composition of bile acids in adiponectin knockout mice, low apoA-I protein level in their bile, worsening of gallbladder inflammation and increased insulin resistance. Also human studies provided evidence for an association between adiponectin and gallstone formation [31]. Interestingly, we detected a nominal significant association of serum adiponectin concentrations with cholelithiasis in females. Effect directions are along the line with previously published data indicating a protective effect of higher adiponectin levels [31,35,55]. Wang and colleagues demonstrated decreased adiponectin concentrations and female gender as risk factors for gallstone disease [31,55]. Gender specific effects or an additive interaction of these 2 risk factors might explain the missing effect in males in our cohort.

Progranulin is widely expressed and comprises growth factor-like and inflammation-related properties [56]. Progranulin has recently been reported as a growth factor which stimulates cholangiocyte proliferation and potentially plays a role in cholangiocarcinoma [57–59]. In C57/BL6 mice progranulin treatment increased biliary mass and decreased sirtuin 1 expression in cholangiocytes [58]. Furthermore it has been demonstrated that hepatocyte specific deletion of sirtuin 1 results in increased gallstone risk in mice potentially via the HNF1 α /FXR pathway [60]. The association of elevated progranulin concentrations in men with increased prevalence of gallstones shown in our study would be consistent with this hypothesis even it is completely unclear how progranulin serum concentrations correlate with biliary or intrahepatic levels. The discrepant regulation in women and potential gender specific effects or interaction with gender specific additional risk factors need to be further elucidated. Functional studies and replication in other cohorts would be required to finally understand the causal pathomechanisms. In our study we did not observe any association between chemerin, vaspin, FGF21 and AFABP serum levels and gallstone disease. To our knowledge, data on interactions between these adipokines and gallstone formation from other studies are not available to date. Chemerin [61,62], vaspin [26,27], FGF21 [29,63] and AFABP [30,64] serum concentrations are altered in obesity and type 2 diabetes as well as related secondary complications. However, to elucidate the potential role in development of cholelithiasis via influence on composition of bile acids, inflammatory processes and hepatic insulin resistance requires further investigation.

Lipid-lowering drugs like statins and cholesterol reabsorption inhibitors acquire an important role for treatment of hypercholesterolemia, not at least because of their potential capability to reduce the cholesterol saturation in bile. Despite the plenty of data regarding this aspect, the efficacy of HMG-CoA reductase inhibitors for gallstone dissolution remains controversial [65–67]. However, there is substantial evidence that statins have effects on the gallstone formation. Therefore, we accounted for lipid-lowering treatment but did not detect any significant differences in the interaction between concentrations of the adipokines included in our study and gallstone formation.

However, we are aware of several limitations of our study. Compared to the existing data our study provided a better statistical power; but nevertheless, power for phenotypically refined subgroups is still limited. Longitudinal data would be inevitable to assess the pathogenetic link between gallstone formation and adipokine serum levels.

Conclusion



So far, in addition to leptin which was explored extensively in mice and also in humans, adiponectin is the only adipocytokine investigated regarding its role in gallstone disease in humans. Consistent with published results we demonstrate a protective effect of higher adiponectin serum concentrations on gallstone risk. Furthermore, we first report an association of progranulin serum levels with cholelithiasis which requires further support by replication studies and functional data.

Acknowledgement



We thank all those who participated in the studies. For excellent technical work we thank Beate Gutschmann, Manuela Prellberg, Ines Müller and Ulrike Lössner.

This work was supported by grants from the German Research Council (SFB- 1052 “Obesity mechanisms”), from the German Diabetes Association and from the DHFD (Diabetes Hilfs- und Forschungsfonds Deutschland), Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), KO 3880/1–2 to PK. AT and PK have been further supported by research grant from the IFB Adiposity Diseases. IFB Adiposity Diseases is supported by the Federal Ministry of Education and Research (BMBF), Germany, FKZ: 01EO1001. DS is funded by the Boehringer Ingelheim Foundation.

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.

References

- 1 Lammert F, Sauerbruch T. Mechanisms of Disease: the genetic epidemiology of gallbladder stones. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 2: 423–433
- 2 Everhart JE, Ruhl CE. Burden of Digestive Diseases in the United States Part III: Liver, Biliary Tract, and Pancreas. *Gastroenterology* 2009; 136: 1134–1144
- 3 Everhart JE, Khare M, Hill M et al. Prevalence and ethnic differences in gallbladder disease in the United States. *Gastroenterology* 1999; 117: 632–639
- 4 Sandler RS, Everhart JE, Donowitz M et al. The burden of selected digestive diseases in the United States. *Gastroenterology* 2002; 122: 1500–1511
- 5 Aerts R, Penninckx F. The burden of gallstone disease in Europe. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 49–53
- 6 Ruhl CE, Everhart JE. Association of diabetes, serum insulin, and c-peptide with gallbladder disease. *Hepatology* 2000; 31: 299–303
- 7 Misciagna G, Guerra V, Di Leo A et al. Insulin and gall stones: a population case control study in southern Italy. *Gut* 2000; 47: 144–147
- 8 Portincasa P, Moschetta A, Palasciano G. Cholesterol gallstone disease. *Lancet* 15 368: 230–239
- 9 Shaffer EA. Gallstone Disease: Epidemiology of gallbladder stone disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 981–996
- 10 Schafmayer C, Hartleb J, Tepel J et al. Predictors of gallstone composition in 1025 symptomatic gallstones from Northern Germany. *BMC Gastroenterol* 2006; 6: 36
- 11 Tsai C-J, Leitzmann MF, Willett WC et al. and Carbohydrate Intake in Relation to Risk of Cholecystectomy in Women. *Gastroenterology* 2005; 129: 105–112
- 12 Attali AF, Capocaccia R, Carulli N et al. Factors associated with gallstone disease in the MICOL experience. *Hepatology* 1997; 26: 809–818
- 13 Barbara L, Sama C, Labate AMM et al. A population study on the prevalence of gallstone disease: The sirmione study. *Hepatology* 1987; 7: 913–917
- 14 The Rome group for epidemiology and prevention of cholelithiasis (GREPCO). The epidemiology of gallstone disease in Rome, Italy. Part II. Factors associated with the disease. *Hepatology* 1988; 8: 907–913
- 15 Jørgensen T. Gall stones in a Danish population. Relation to weight, physical activity, smoking, coffee consumption, and diabetes mellitus. *Gut* 1989; 30: 528–534

- 16 Shiffman ML, Kaplan GD. Prophylaxis against gallstone formation with ursodeoxycholic acid in patients participating in a very-low-calorie diet program. *Ann Intern Med* 1995; 122: 899–905
- 17 Syngal S, Coakley EH. Long-term weight patterns and risk for cholecystectomy in women. *Ann Intern Med* 1999; 130: 471
- 18 Grundy SM. Cholesterol gallstones: a fellow traveler with metabolic syndrome? *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1–2
- 19 Kovacs P, Wittenburg H, Kurtz U. Hepatic insulin resistance ties cholesterol formation and the metabolic syndrome. *Ann Hepatol* 2008; 7: 262–264
- 20 Trujillo ME, Scherer PE. Adipose Tissue-Derived Factors: Impact on Health and Disease. *Endocr Rev* 2006; 27: 762–778
- 21 Hotta K, Funahashi T, Arita Y et al. Plasma Concentrations of a Novel, Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Type 2 Diabetic Patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1595–1599
- 22 Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ Is a Novel Adipose-specific Gene Dysregulated in Obesity. *J Biol Chem* 1996; 271: 10697–10703
- 23 Ackermann D, Jones J, Barona J et al. Waist circumference is positively correlated with markers of inflammation and negatively with adiponectin in women with metabolic syndrome. *Nutr Res* 2011; 31: 197–204
- 24 Bozaoglu K, Bolton K, McMillan J et al. Chemerin Is a Novel Adipokine Associated with Obesity and Metabolic Syndrome. *Endocrinology* 2007; 148: 4687–4694
- 25 Youn B-S, Bang S-I, Klötting N et al. Serum Progranulin Concentrations May Be Associated With Macrophage Infiltration Into Omental Adipose Tissue. *Diabetes* 2009; 58: 627–636
- 26 Youn B-S, Klötting N, Kratzsch J et al. Serum Vaspin Concentrations in Human Obesity and Type 2 Diabetes. *Diabetes* 2008; 57: 372–377
- 27 Klötting N, Berndt J, Kralisch S et al. Vaspin gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 339: 430–436
- 28 Hida K, Wada J, Eguchi J et al. Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: A unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 10610–10615
- 29 Zhang X, Yeung DC, Karpisek M et al. Serum FGF21 Levels Are Increased in Obesity and Are Independently Associated With the Metabolic Syndrome in Humans. *Diabetes* 2008; 57: 1246–1253
- 30 Xu A, Wang Y, Xu JY et al. Protein Is a Plasma Biomarker Closely Associated with Obesity and Metabolic Syndrome. *Clin Chem* 2006; 52: 405–413
- 31 Wang S, Yeh Y, Yu M et al. Hyperleptinaemia and hypoadiponectinaemia are associated with gallstone disease. *Eur J Clin Invest* 2006; 36: 176–180
- 32 Wang S-N, Yeh Y-T, Wang S-T et al. Decreased Retinol Binding Protein 4 Concentrations are Associated With Cholesterol Gallstone Disease. *J Formos Med Assoc* 2010; 109: 422–429
- 33 Wang SN, Yeh YT, Wang ST et al. Visfatin- a proinflammatory adipokine- in gallstone disease. *Am J Surg* 2010; 199: 459–465
- 34 Méndez-Sánchez NB-ML, Viñals Y, Chavez-Tapia NC et al. Serum leptin levels and insulin resistance are associated with gallstone disease in overweight subjects. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6182–6187
- 35 Ogiyama H, Kamada Y, Kiso S et al. Lack of adiponectin promotes formation of cholesterol gallstones in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 399: 352–358
- 36 Bouchard G, Johnson D, Carver T et al. Cholesterol gallstone formation in overweight mice establishes that obesity per se is not linked directly to cholelithiasis risk. *J Lipid Res* 2002; 43: 1105–1113
- 37 Hyogo H, Roy S, Cohen DE. Restoration of gallstone susceptibility by leptin in C57BL/6J ob/ob mice. *Journal of Lipid Research* 2003; 44: 1232–1240
- 38 Ko CW, Beresford SAA, Schulte SJ et al. Incidence, natural history, and risk factors for biliary sludge and stones during pregnancy. *Hepatology* 2005; 41: 359–365
- 39 Ruhl CE, Everhart JE. Relationship of serum leptin concentration and other measures of adiposity with gallbladder disease. *Hepatology* 2001; 34: 877–883
- 40 Tönjes A, Koriath M, Schleinitz D et al. Genetic variation in GPR133 is associated with height: genome wide association study in the self-contained population of Sorbs. *Human Mol Genet* 2009; 18: 4662–4668
- 41 Tonjes A, Zeggini E, Kovacs P et al. Association of FTO variants with BMI and fat mass in the self-contained population of Sorbs in Germany. *Eur J Hum Genet* 2010; 18: 104–110
- 42 Veeramah KR, Tonjes A, Kovacs P et al. Genetic variation in the Sorbs of eastern Germany in the context of broader European genetic diversity. *Eur J Hum Genet* 2011; 19: 995–1001
- 43 American Diabetes Association (ADA). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2009; 32 (Supplement 1): S62–S67
- 44 Matthews D, Hosker JP, Rudenski AS et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412–419
- 45 Méndez-Sánchez N, Chavez-Tapia NC, Motola-Kuba D et al. Metabolic syndrome as a risk factor for gallstone disease. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1653–1657
- 46 Nakeeb A, Comuzzie AG, Al-Azzawi H et al. Insulin resistance causes human gallbladder dysmotility. *J Gastrointest Surg* 2006; 10: 940–948 discussion 948–949
- 47 Biddinger SB, Haas JT, Yu BB et al. Hepatic insulin resistance directly promotes formation of cholesterol gallstones. *Nat Med* 2008; 14: 778–782
- 48 Weyer C, Funahashi T, Tanaka S et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1930–1935
- 49 Chavez AO, Molina-Carrion M, Abdul-Ghani MA et al. Circulating Fibroblast Growth Factor-21 Is Elevated in Impaired Glucose Tolerance and Type 2 Diabetes and Correlates With Muscle and Hepatic Insulin Resistance. *Diabetes Care* 2009; 32: 1542–1546
- 50 Uysal KT, Scheja L, Wiesbrock SM et al. Improved Glucose and Lipid Metabolism in Genetically Obese Mice Lacking aP2. *Endocrinology* 2000; 141: 3388–3396
- 51 Tso AW, Xu A, Sham PC et al. Protein as a New Biomarker Predicting the Development of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30: 2667–2672
- 52 Berglund ED, Li CY, Bina HA et al. Fibroblast Growth Factor 21 Controls Glycemia via Regulation of Hepatic Glucose Flux and Insulin Sensitivity. *Endocrinology* 2009; 150: 4084–4093
- 53 Berg AH, Combs TP, Du X et al. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 2001; 7: 947–953
- 54 Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002; 8: 1288–1295
- 55 Wang SN, Yeh YT, Yu ML et al. Serum adiponectin levels in cholesterol and pigment cholelithiasis. *Br J Surg* 2006; 93: 981–986
- 56 Nguyen AD, Nguyen TA, Martens LH et al. Progranulin: at the interface of neurodegenerative and metabolic diseases. *Trends Endocrinol Metab* 2013; 24: 597–606
- 57 Ho JC, Ip YC, Cheung ST et al. Granulin-epithelin precursor as a therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 47: 1524–1532
- 58 Frampton G, Ueno Y, Quinn M et al. The novel growth factor, progranulin, stimulates mouse cholangiocyte proliferation via sirtuin-1-mediated inactivation of FOXO1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; 303: G1202–G1211
- 59 Frampton G, Invernizzi P, Bernuzzi F et al. Interleukin-6-driven progranulin expression increases cholangiocarcinoma growth by an Akt-dependent mechanism. *Gut* 2012; 61: 268–277
- 60 Purushotham A, Xu Q, Lu J et al. Hepatic Deletion of SIRT1 Decreases Hepatocyte Nuclear Factor 1α/Farnesoid X Receptor Signaling and Induces Formation of Cholesterol Gallstones in Mice. *Mol Cell Biol* 2012; 32: 1226–1236
- 61 Ouwens DM, Bekaert M, Lapauw B et al. Chemerin as biomarker for insulin sensitivity in males without typical characteristics of metabolic syndrome. *Arch Physiol Biochem* 2012; 118: 135–138
- 62 Chakaroun R, Raschpichler M, Klötting N et al. Effects of weight loss and exercise on chemerin serum concentrations and adipose tissue expression in human obesity. *Metabolism* 2012; 61: 706–714
- 63 Mraz M, Bartlova M, Lacinova Z et al. Serum concentrations and tissue expression of a novel endocrine regulator fibroblast growth factor-21 in patients with type 2 diabetes and obesity. *Clin Endocrinol* 2009; 71: 369–375
- 64 Maeda K, Cao H, Kono K et al. Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes. *Cell Metab* 2005; 1: 107–119
- 65 Caroli-Bosc FX, Le Gall P, Pugliese P et al. General Practitioners' Group of Vidauban: Role of fibrates and HMG-CoA reductase inhibitors in gallstone formation: epidemiological study in an unselected population. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 540–544
- 66 Erichsen R, Frøslev T, Lash TL et al. Long-term statin use and the risk of gallstone disease: A population-based case-control study. *Am J Epidemiol* 2011; 173: 162–170
- 67 Smith JL, Roach PD, Wittenberg LN et al. Effects of simvastatin on hepatic cholesterol metabolism, bile lithogenicity and bile acid hydrophobicity in patients with gallstones. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 871–879

3. Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zu Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Serum adiponectin und progranulin levels are associated with gallstone disease

eingereicht von Ruth Sandvoß, geb. Völkl

angefertigt an der Klinik und Poliklinik für Endokrinologie und Nephrologie der Universität Leipzig

betreut von PD Dr. Anke Tönjes und Dr. rer. nat. Jana Breitfeld

eingereicht im Mai 2017

Gallensteine stellen ein erhebliches gesundheitsökonomisches Problem dar. Komplikationen wie Entzündungen der Gallenwege, Cholestase oder Pankreatitis führen zu steigenden Hospitalisierungsraten. Risikofaktoren für die Entstehung von Gallensteinen sind Alter, weibliches Geschlecht, die Einnahme bestimmter Medikamente (wie z.B. Ovulationshemmer oder Fibrate) und die Folgen einer Überernährung wie Diabetes mellitus oder Adipositas. Pathogenetisch liegt eine Übersättigung der Gallenflüssigkeit mit Cholesterol vor, die in Kombination mit anderen steinfördernden Faktoren zur Bildung von Cholesterolgallensteinen führt. Pigmentgallensteine bestehen überwiegend aus Kalziumbilirubinat. Diese können durch eine verminderte Glucuronidierung von Bilirubin oder durch eine erhöhte Bilirubinproduktion vermehrt anfallen. Pigmentgallensteine spielen aufgrund der wesentlich geringeren Häufigkeit eine untergeordnete Rolle.

Das Fettgewebe fungiert nicht nur als Fettdepot im Sinne eines Energiespeichers, sondern sezerniert auch Proteine mit hormonähnlicher Wirkung, sogenannte Adipozytokine oder Adipokine. Es gibt zahlreiche statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen Adipokinen und dem Auftreten adipositasassoziierter Erkrankungen. Für Adiponectin, Visfatin, Leptin und das Retinolbindende Protein 4 konnte eine Assoziation mit dem Auftreten von Gallensteinen belegt werden, was uns zum Aufstellen der Hypothese veranlasste, dass eine Assoziation der Cholelithiasis mit Adiponectin-, Chemerin-, Vaspin-, Progranulin-, FGF21- und AFABP-Serumspiegeln vorliegen könnte. Dies zu prüfen sollte Ziel der vorliegenden Arbeit sein. Dazu wurde eine Studie an 1022 Sorben, einer nationalen Minderheit aus der

Oberlausitz, ausgewertet. 189 Probanden waren Gallensteinträger, 833 Probanden ohne sonografisch nachweisbare Gallensteine stellten die Kontrollgruppe dar.

Die Serumkonzentrationen von Adiponectin, Chemerin, Vaspin, Progranulin, FGF21 und AFABP der Probanden wurden mittels ELISA gemessen. Um sekundäre Effekte aufgrund der Assoziation der Cholelithiasis mit Diabetes mellitus Typ 2 zu vermeiden, wurden verschiedene Subgruppen gebildet: Gesamtkohorte (n=1022), Nicht-Diabetiker (n=892) und Diabetiker (n=104). Der Diabetes mellitus Typ 2 wurde mittels OGTT (oraler Glucosetoleranztest) gemäß der American Diabetes Association diagnostiziert. Um Sekundäreffekte durch lipidsenkende Medikamente zu vermeiden wurde außerdem eine Subgruppe von Nicht-Diabetikern ohne lipidsenkende Therapie gebildet.

Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Mittels logistischer Regressionsanalyse wurden nach Adjustierung auf Alter, Geschlecht und BMI (body mass index) Assoziationen mit dem Gallensteinstatus für jedes Adipokin untersucht. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der Statistiksoftware SPSS (Version 20.0.1, Inc., Chicago, IL).

Die Assoziation von Alter, weiblichem Geschlecht, BMI und Diabetes mellitus Typ 2 mit einem erhöhten Gallensteinrisiko konnte bestätigt werden. Bei Frauen waren erhöhte Konzentrationen von Adiponectin mit einem niedrigeren Gallensteinrisiko nominal assoziiert ($p=0,036$, Odds Ratio (OR) 0,47, 95% Konfidenzintervall (CI) [0,23; 0,95]), was ebenfalls bereits existierende Daten bestätigt. Bei den männlichen Gallensteinträgern hingegen war im Vergleich zu den Kontrollen der Progranulinspiegel signifikant erhöht ($p=0,012$, OR 6,1, 95% CI [1,5; 24,9]). Progranulin ist ein multifunktionales Protein, das von zahlreichen Geweben exprimiert wird. Erst kürzlich wurde Progranulin als Wachstumsfaktor beschrieben, der die Proliferation von Cholangiozyten stimuliert und bei der Entstehung des Cholangiokarzinoms eine Rolle spielen könnte. In C57/BL6-Mäusen führte die Verabreichung von Progranulin zu einem mengenmäßigen Anstieg der Galle und zu einem Abfall der Sirtuin-1-Expression in Cholangiozyten. Außerdem zeigte sich ein erhöhtes Gallensteinrisiko in Mäusen mit einer *SIRT1*-Deletion in Hepatozyten. Die Assoziation von erhöhtem Progranulinspiegeln mit erhöhtem Gallensteinrisiko in der vorliegenden Arbeit wäre konsistent mit diesen Ergebnissen, wobei unklar bleibt wie die Serumkonzentration von Progranulin mit der Konzentration in der Gallenblase und in den intrahepatischen Gallenwegen korreliert. Zur genauen Klärung des Pathomechanismus sind jedoch weitere Studien erforderlich.

Zwischen Gallensteinträgern und Kontrollgruppe der Gesamtkohorte gab es keinen signifikanten Unterschied in den Serumkonzentration von Vaspin, Chemerin, FGF21, Adiponectin, AFABP und Progranulin.

Statine spielen eine große Rolle in der Behandlung der Hypercholesterinämie. Trotz zahlreicher Daten zu diesem Thema wird die Wirksamkeit von HMG-CoA-Reduktase-

Hemmern in der Therapie der Cholelithiasis kontrovers diskutiert. Wir konnten innerhalb unserer Kohorte keine signifikanten Effekte durch eine Statintherapie ermitteln. Limitationen unserer Studie sind jedoch geringe Stichprobengrößen innerhalb der Subgruppen und somit eingeschränkte statistische Power. Es sind weitere longitudinale Studien erforderlich um eine mögliche Modifikation des Gallensteinrisikos durch die Wirkung von Adipokinen zu erfassen.

4. Literaturverzeichnis

1. Lammert F, Sauerbruch T: *Mechanisms of Disease: The genetic epidemiology of gallbladder stones*. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 2005;2(9):423-433.
2. Aerts R, Penninckx F: *The burden of gallstone disease in Europe*. Aliment Pharmacol Ther 2003;18:49-53.
3. Lammert F, Neubrand MW, Bittner R, Feussner H, Greiner L, Hagenmüller F, Kiehne KH, Ludwig K, Neuhaus H, Paumgartner G, Riemann JF, Sauerbruch T: *S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten und der Deutschen Gesellschaft für Viszeralchirurgie zur Diagnostik und Behandlung von Gallensteinen*. Z Gastroenterol 2007;45(09):971-1001.
4. Shaffer EA: *Gallstone Disease: Epidemiology of gallbladder stone disease*. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2006;20(6):981-996.
5. Ruhl CE, Everhart JE: *Association of diabetes, serum insulin, and c-peptide with gallbladder disease*. Hepatology 2000;31(2):299-303.
6. Tsai C-J, Leitzmann MF, Willett WC, Giovannucci EL: *Glycemic Load, Glycemic Index, and Carbohydrate Intake in Relation to Risk of Cholecystectomy in Women*. Gastroenterology 2005;129(1):105-112.
7. Grundy SM: *Cholesterol gallstones: a fellow traveler with metabolic syndrome?* Am J Clin Nutr 2004 80 (1):1-2
8. Biddinger SB, Haas JT, Yu BB, Bezy O, Jing E, Zhang W, Unterman TG, Carey MC, Kahn CR: *Hepatic insulin resistance directly promotes formation of cholesterol gallstones*. Nat Med 2008;14(7):778-782.
9. Kovacs P, Wittenburg H, Kurtz U: *Hepatic insulin resistance ties cholesterol formation and the metabolic syndrome*. Ann Hepatol 2008;7(3):262-264.
10. Wang SN, Yeh YT, Yu ML, Dai CY, Chi WC, Chung WL, Lee KT: *Hyperleptinaemia and hypoadiponectinaemia are associated with gallstone disease*. Eur J Clin Invest 2006;36(3):176-180.
11. Wang SN, Yeh YT, Wang ST, Chen YL, Chuang SC, Ker CG, Lee KT: *Decreased Retinol Binding Protein 4 Concentrations are Associated With Cholesterol Gallstone Disease*. J Formos Med Assoc 2010;109(6):422-429.
12. Wang SN, Yeh YT, Wang ST, Chuang SC, Wang CL, Yu ML, Lee KT. *Visfatin- a proinflammatory adipokine- in gallstone disease*. Am J Surg 2010;199(4):459-465.
13. Méndez-Sánchez N, Bermejo-Martínez LB, Viñals Y, Chavez-Tapia NC, Vander Graff I, Ponciano-Rodríguez G, Ramos MH, Uribe M: *Serum leptin levels and insulin resistance are associated with gallstone disease in overweight subjects*. World J Gastroenterol 2005;11(39):6182-6187.

14. Schafmayer C, Hartleb J, Tepel J, Albers S, Freitag S, Völzke H, Buch S, Seeger M, Timm B, Kremer B, Fölsch UR, Fändrich F, Krawczak M, Schreiber S, Hampe J: *Predictors of gallstone composition in 1025 symptomatic gallstones from Northern Germany*. BMC Gastroenterol 2006;6(1):36.
15. Portincasa P, Moschetta A, Palasciano G: *Cholesterol gallstone disease*. The Lancet 2006;368(9531):230-239.
16. Paumgartner G, Sauerbruch T: *Gallstones: pathogenesis*. The Lancet;338(8775):1117-1121.
17. Strasberg S, Harvey P: *Biliary cholesterol transport and precipitation: introduction and overview of conference*. Hepatology 1990;12:1S-5S.
18. Admirand WH, Small DM: *The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man*. The Journal of Clinical Investigation 1968;47(5):1043-1052.
19. Wang D, Carey M: *Characterization of crystallization pathways during cholesterol precipitation from human gallbladder bile: identical pathways to corresponding model bile with three predominating sequences*. J lipid res 1996;37:2539-2549.
20. van Erpecum K: *Pathogenesis of cholesterol and pigment gallstones: An update*. Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology 2011;35(4):281-287.
21. Cahalane M, Neubrand M, Carey M: *Physical-chemical pathogenesis of pigment gallstones*. Semin Liver Dis 1988;8(4):317-328.
22. Wittenburg H, Lammert F: *Genetic Predisposition to Gallbladder Stones*. Semin Liver Dis 2007;27(01):109-121.
23. Trujillo ME, Scherer PE: *Adipose Tissue-Derived Factors: Impact on Health and Disease*. Endocr Rev 2006 27 (7):762-778
24. Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE: *The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action*. Nat Med 2001;7(8):947-953.
25. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T: *Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase*. Nat Med 2002;8(11):1288-1295.
26. Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J, Eto K, Yamashita T, Kamon J, Satoh H, Yano W, Froguel P, Nagai R, Kimura S, Kadowaki T, Noda T: *Disruption of Adiponectin Causes Insulin Resistance and Neointimal Formation*. Journal of Biological Chemistry 2002 277 (29):25863-25866
27. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozawa N, Hioki K, Uchida S, Ito Y, Takakuwa K, Matsui J, Takata M, Eto K, Terauchi Y, Komeda K, Tsunoda M, Murakami K, Ohnishi Y, Naitoh T, Yamamura K, Ueyama Y, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T:

Globular Adiponectin Protected ob/ob Mice from Diabetes and ApoE-deficient Mice from Atherosclerosis. Journal of Biological Chemistry 2003 278 (4):2461-2468

28. Shibata R, Sato K, Pimentel DR, Takemura Y, Kihara S, Ohashi K, Funahashi T, Ouchi N, Walsh K: *Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms.* Nat Med 2005;11(10):1096-1103.

29. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y: *Plasma Concentrations of a Novel, Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Type 2 Diabetic Patients.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000;20(6):1595-1599.

30. Hu E, Liang P, Spiegelman BM: *AdipoQ Is a Novel Adipose-specific Gene Dysregulated in Obesity.* J Biol Chem 1996 271 (18):10697-10703

31. Milan G, Granzotto M, Scarda A, Calcagno A, Pagano C, Federspil G, Vettor R: *Resistin and Adiponectin Expression in Visceral Fat of Obese Rats: Effect of Weight Loss.* Obes Res 2002;10(11):1095-1103.

32. Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, Chen CL, Tai TY, Chuang LM: *Weight Reduction Increases Plasma Levels of an Adipose-Derived Anti-Inflammatory Protein, Adiponectin.* Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2001 86 (8):3815-3819

33. Kim SM, Cho GJ, Yannakoulia M, Hwang TG, Kim IH, Park EK, Mantzoros CS: *Lifestyle modification increases circulating adiponectin concentrations but does not change vaspin concentrations.* Metabolism 2011;60(9):1294-1299.

34. Monzillo LU, Hamdy O, Horton ES, Ledbury S, Mullooly C, Jarema C, Porter S, Ovalle K, Moussa A, Mantzoros CS: *Effect of Lifestyle Modification on Adipokine Levels in Obese Subjects with Insulin Resistance.* Obes Res 2003;11(9):1048-1054.

35. Ackermann D, Jones J, Barona J, Calle MC, Kim JE, LaPia B, Volek JS, McIntosh M, Kalynych C, Najm W, Lerman RH, Fernandez ML: *Waist circumference is positively correlated with markers of inflammation and negatively with adiponectin in women with metabolic syndrome.* Nutrition Research 2011;31(3):197-204.

36. Wang SN, Yeh YT, Yu ML, Dai CY, Chi WC, Chung WL, Lee KT: *Hyperleptinaemia and hypoadiponectinaemia are associated with gallstone disease.* European Journal of Clinical Investigation 2006;36(3):176-180.

37. Ogiyama H, Kamada Y, Kiso S, Araki H, Yamada T, Nishihara T, Watabe K, Tochino Y, Kihara S, Funahashi T, Kanno K, Shimomura I, Tsutsui S, Tazuma S, Hayashi N: *Lack of adiponectin promotes formation of cholesterol gallstones in mice.* Biochemical and Biophysical Research Communications 2010;399(3):352-358.

38. Eriksen JL, Mackenzie IRA: *Progranulin: normal function and role in neurodegeneration*. Journal of Neurochemistry 2008;104(2):287-297.
39. Eriksen JL, Mackenzie IR. *Progranulin: normal function and role in neurodegeneration*. Journal of Neurochemistry 2008;104(2):287-297.
40. Lu R, Serrero G: *Inhibition of PC cell-derived growth factor (PCDGF, epithelin/granulin precursor) expression by antisense PCDGF cDNA transfection inhibits tumorigenicity of the human breast carcinoma cell line MDA-MB-468*. Proceedings of the National Academy of Sciences 2000 97 (8):3993-3998
41. Davidson B, Alejandro E, Flørenes VA, Goderstad JM, Risberg B, Kristensen GB, Trope CG, Kohn EC: *Granulin-epithelin precursor is a novel prognostic marker in epithelial ovarian carcinoma*. Cancer 2004;100(10):2139-2147.
42. Youn BS, Bang SI, Klötting N, Park JW, Lee N, Oh JE, Pi KB, Lee TH, Ruschke K, Fasshauer M, Stumvoll M, Blüher M: *Serum Progranulin Concentrations May Be Associated With Macrophage Infiltration Into Omental Adipose Tissue*. Diabetes 2009 58 (3):627-636
43. Matsubara T, Mita A, Minami K, Hosooka T, Kitazawa S, Takahashi K, Tamori Y, Yokoi N, Watanabe M, Matsuo E, Nishimura O, Seino S: *PGRN is a Key Adipokine Mediating High Fat Diet-Induced Insulin Resistance and Obesity through IL-6 in Adipose Tissue*. Cell Metabolism 2012;15(1):38-50.
44. Ho JC, Ip YC, Cheung ST, Lee YT, Chan KF, Wong SY, Fan ST: *Granulin-epithelin precursor as a therapeutic target for hepatocellular carcinoma*. Hepatology 2008;47(5):1524-1532.
45. Frampton G, Invernizzi P, Bernuzzi F, Pae HY, Quinn M, Horvat D, Galindo C, Huang L, McMillin M, Cooper B, Rimassa L, DeMorrow S: *Interleukin-6-driven progranulin expression increases cholangiocarcinoma growth by an Akt-dependent mechanism*. Gut 2012;61(2):268-277.
46. Frampton G, Ueno Y, Quinn M, McMillin M, Pae HY, Galindo C, Leyva-Illades D, DeMorrow S: *The novel growth factor, progranulin, stimulates mouse cholangiocyte proliferation via sirtuin-1-mediated inactivation of FOXO1*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2012;303(11):G1202-G1211.
47. Purushotham A, Xu Q, Lu J, Foley JF, Yan X, Kim DH, Kemper JK, Li X: *Hepatic Deletion of SIRT1 Decreases Hepatocyte Nuclear Factor 1 α /Farnesoid X Receptor Signaling and Induces Formation of Cholesterol Gallstones in Mice*. Mol Cell Biol 2012;32(7):1226-1236.
48. Zabel BA, Allen SJ, Kulig P, Allen JA, Cichy J, Handel TM, Butcher EC: *Chemerin Activation by Serine Proteases of the Coagulation, Fibrinolytic, and Inflammatory Cascades*. Journal of Biological Chemistry 2005;280(41):34661-34666.

49. Wittamer V, Franssen JD, Vulcano M, Mirjolet JF, Le Poul E, Migeotte I, Brézillon S, Tyldesley R, Blanpain C, Detheux M, Mantovani A, Sozzani S, Vassart G, Parmentier M, Communi D: *Specific Recruitment of Antigen-presenting Cells by Chemerin, a Novel Processed Ligand from Human Inflammatory Fluids*. The Journal of Experimental Medicine 2003 198 (7):977-985
50. Bozaoglu K, Bolton K, McMillan J, Zimmet P, Jowett J, Collier G, Walder K, Segal D: *Chemerin Is a Novel Adipokine Associated with Obesity and Metabolic Syndrome*. Endocrinology 2007 148 (10):4687-4694
51. Becker M, Rabe K, Lebherz C, Zugwurst J, Göke B, Parhofer KG, Lehrke M, Broedl UC: *Expression of Human Chemerin Induces Insulin Resistance in the Skeletal Muscle but Does Not Affect Weight, Lipid Levels, and Atherosclerosis in LDL Receptor Knockout Mice on High-Fat*. Diabetes 2010 59 (11):2898-2903
52. Sell H, Laurencikiene J, Taube A, Eckardt K, Cramer A, Horrigs A, Arner P, Eckel J: *Chemerin Is a Novel Adipocyte-Derived Factor Inducing Insulin Resistance in Primary Human Skeletal Muscle Cells*. Diabetes 2009 58 (12):2731-2740
53. Chakaroun R, Raschpichler M, Klöting N, Oberbach A, Flehmig G, Kern M, Schön MR, Shang E, Lohmann T, Dreßler M, Fasshauer M, Stumvoll M, Blüher M: *Effects of weight loss and exercise on chemerin serum concentrations and adipose tissue expression in human obesity*. Metabolism 2012;61(5):706-714.
54. Weigert J, Neumeier M, Wanninger J, Filarsky M, Bauer S, Wiest R, Farkas S, Scherer MN, Schäffler A, Aslanidis C, Schölmerich J, Buechler C: *Systemic chemerin is related to inflammation rather than obesity in type 2 diabetes*. Clinical Endocrinology 2010;72(3):342-348.
55. Hida K, Wada J, Eguchi J, Zhang H, Baba M, Seida A, Hashimoto I, Okada T, Yasuhara A, Nakatsuka A, Shikata K, Hourai S, Futami J, Watanabe E, Matsuki Y, Hiramatsu R, Akagi S, Makino H, Kanwar YS: *Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: A unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2005;102(30):10610-10615.
56. Youn BS, Klöting N, Kratzsch J, Lee N, Park JW, Song ES, Ruschke K, Oberbach A, Fasshauer M, Stumvoll M, Blüher M: *Serum Vaspin Concentrations in Human Obesity and Type 2 Diabetes*. Diabetes February 2008;57(2):372-377.
57. Klöting N, Berndt J, Kralisch S, Kovacs P, Fasshauer M, Schön MR, Stumvoll M, Blüher M: *Vaspin gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes*. Biochem Biophys Res Commun 2006;339(1):430-436.
58. von Loeffelholz C, Möhlig M, Arafat AM, Isken F, Spranger J, Mai K, Randeva HS, Pfeiffer AF, Weickert MO: *Circulating vaspin is unrelated to insulin sensitivity in a cohort of nondiabetic humans*. European Journal of Endocrinology 2010;162(3):507-513.

59. Lee MK, Jekal Y, Im JA, Kim E, Lee SH, Park JH, Chu SH, Chung KM, Lee HC, Oh EG, Kim SH, Jeon JY: *Reduced serum vaspin concentrations in obese children following short-term intensive lifestyle modification*. Clinica Chimica Acta 2010;411(5-6):381-385.
60. Kim SM, Cho GJ, Yannakoulia M, Hwang TG, Kim IH, Park EK, Mantzoros CS: *Lifestyle modification increases circulating adiponectin concentrations but does not change vaspin concentrations*. Metabolism 2011; 60(9):1294-9
61. Xu J, Stanislaus S, Chinookoswong N, Lau YY, Hager T, Patel J, Ge H, Weiszmann J, Lu SC, Graham M, Busby J, Hecht R, Li YS, Li Y, Lindberg R, Véniant MM: *Acute glucose-lowering and insulin-sensitizing action of FGF21 in insulin-resistant mouse models - association with liver and adipose tissue effects*. American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism 2009;297(5):E1105-E1114.
62. Kharitonov A, Shiyanova TL, Koester A, Ford AM, Micanovic R, Galbreath EJ, Sandusky GE, Hammond LJ, Moyers JS, Owens RA, Gromada J, Brozinick JT, Hawkins ED, Wroblewski VJ, Li DS, Mehrbod F, Jaskunas SR, Shanafelt AB: *FGF-21 as a novel metabolic regulator*. The Journal of Clinical Investigation 2005;115(6):1627-1635.
63. Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, Itoh N: *Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression 2000;1492(1):203-206.
64. Wente W, Efanov AM, Brenner M, Kharitonov A, Köster A, Sandusky GE, Sewing S, Treinies I, Zitzer H, Gromada J: *Fibroblast Growth Factor-21 Improves Pancreatic beta-Cell Function and Survival by Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 and Akt Signaling Pathways*. Diabetes September 2006;55(9):2470-2478.
65. Kralisch S, Fasshauer M: *Fibroblast growth factor 21: effects on carbohydrate and lipid metabolism in health and disease*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2011;14(4):354-9.
66. Mraz M, Bartlova M, Lacinova Z, Michalsky D, Kasalicky M, Haluzikova D, Matoulek M, Dostalova I, Humenanska V, Haluzik M: *Serum concentrations and tissue expression of a novel endocrine regulator fibroblast growth factor-21 in patients with type 2 diabetes and obesity*. Clinical Endocrinology 2009;71(3):369-375.
67. Chavez AO, Molina-Carrion M, Abdul-Ghani MA, Folli F, DeFronzo RA, Tripathy D: *Circulating Fibroblast Growth Factor-21 Is Elevated in Impaired Glucose Tolerance and Type 2 Diabetes and Correlates With Muscle and Hepatic Insulin Resistance*. Diabetes Care 2009 32 (8):1542-1546
68. Zhang X, Yeung DC, Karpisek M, Stejskal D, Zhou ZG, Liu F, Wong RL, Chow WS, Tso AW, Lam KS, Xu A: *Serum FGF21 Levels Are Increased in Obesity and Are Independently Associated With the Metabolic Syndrome in Humans*. Diabetes May 2008;57(5):1246-1253.

69. Eto K, Tumenbayar B, Nagashima S, Tazoe F, Miyamoto M, Takahashi M, Ando A, Okada K, Yagyu H, Ishibashi S: *Distinct association of serum FGF21 or adiponectin levels with clinical parameters in patients with type 2 diabetes*. Diabetes Research and Clinical Practice 2010;89(1):52-57.
70. Mai K, Andres J, Biedasek K, Weicht J, Bobbert T, Sabath M, Meinus S, Reinecke F, Möhlig M, Weickert MO, Clemenz M, Pfeiffer AF, Kintscher U, Spuler S, Spranger J: *Free Fatty Acids Link Metabolism and Regulation of the Insulin-Sensitizing Fibroblast Growth Factor-21*. Diabetes 2009;58(7):1532-1538.
71. Mai K, Schwarz F, Bobbert T, Andres J, Assmann A, Pfeiffer AF, Spranger J: *Relation between fibroblast growth factor-21, adiposity, metabolism, and weight reduction*. Metabolism 2011;60(2):306-311.
72. Hojman P, Pedersen M, Nielsen AR, Krogh-Madsen R, Yfanti C, Akerstrom T, Nielsen S, Pedersen BK: *Fibroblast Growth Factor-21 Is Induced in Human Skeletal Muscles by Hyperinsulinemia*. Diabetes 2009;58(12):2797-2801.
73. Muise ES, Azzolina B, Kuo DW, El-Sherbeini M, Tan Y, Yuan X, Mu J, Thompson JR, Berger JP, Wong KK: *Adipose Fibroblast Growth Factor 21 Is Up-Regulated by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma and Altered Metabolic States*. Molecular Pharmacology 2008 74 (2):403-412
74. Xu A, Wang Y, Xu JY, Stejskal D, Tam S, Zhang J, Wat NM, Wong WK, Lam KS: *Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein Is a Plasma Biomarker Closely Associated with Obesity and Metabolic Syndrome*. Clin Chem 2006;52(3):405-413.
75. Makowski L, Boord JB, Maeda K, Babaev VR, Uysal KT, Morgan MA, Parker RA, Suttles J, Fazio S, Hotamisligil GS, Linton MF.:*Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis*. Nat Med 2001;7(6):699-705.
76. Maeda K, Cao H, Kono K, Gorgun CZ, Furuhashi M, Uysal KT, Cao Q, Atsumi G, Malone H, Krishnan B, Minokoshi Y, Kahn BB, Parker RA, Hotamisligil GS: *Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes*. Cell Metabolism 2005;1(2):107-119.
77. Hotamisligil GkS, Johnson RS, Distel RJ, Ellis R, Papaioannou VE, Spiegelman BM: *Uncoupling of Obesity from Insulin Resistance Through a Targeted Mutation in aP2, the Adipocyte Fatty Acid Binding Protein*. Science 1996;274(5291):1377-1379.
78. Boord JB, Maeda K, Makowski L, Babaev VR, Fazio S, Linton MF, Hotamisligil GS: *Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein, aP2, Alters Late Atherosclerotic Lesion Formation in Severe Hypercholesterolemia*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2002 22 (10):1686-1691

79. Tönjes A, Kralisch S, Lössner U, Kovacs P, Blüher M, Stumvoll M, Fasshauer M: *Metabolic and genetic predictors of circulating adipocyte fatty acid-binding protein*. Int J Obes (Lond) 2012;36(6):766-73.
80. Xu A, Tso AW, Cheung BM, Wang Y, Wat NM, Fong CH, Yeung DC, Janus ED, Sham PC, Lam KS: *Circulating Adipocyte-Fatty Acid Binding Protein Levels Predict the Development of the Metabolic Syndrome: A 5-Year Prospective Study*. Circulation 2007;115(12):1537-1543.
81. Tso AW, Xu A, Sham PC, Wat NM, Wang Y, Fong CH, Cheung BM, Janus ED, Lam KS: *Serum Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein as a New Biomarker Predicting the Development of Type 2 Diabetes*. Diabetes Care 2007 30 (10):2667-2672
82. Yeung DC, Xu A, Cheung CW, Wat NM, Yau MH, Fong CH, Chau MT, Lam KS: *Serum Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein Levels Were Independently Associated With Carotid Atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007;27(8):1796-1802.
83. Kralisch S, Stepan H, Kratzsch J, Verlohren M, Verlohren HJ, Drynda K, Lössner U, Blüher M, Stumvoll M, Fasshauer M: *Serum levels of adipocyte fatty acid binding protein are increased in gestational diabetes mellitus*. Eur J Endocrinol 2009;160(1):33-38.
84. Shangguan X, Liu F, Wang H, He J, Dong M: *Alterations in serum adipocyte fatty acid binding protein and retinol binding protein-4 in normal pregnancy and preeclampsia*. Clinica Chimica Acta 2009;407(1-2):58-61.
85. Milner KL, van der Poorten D, Xu A, Bugianesi E, Kench JG, Lam KS, Chisholm DJ, George J: *Adipocyte fatty acid binding protein levels relate to inflammation and fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology 2009;49(6):1926-1934.
86. Hyun Koh J, Goo Shin Y, Min Nam S, Young Lee M, Hee Chung C, Yel Shin J: *Serum Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein Levels Are Associated With Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Type 2 Diabetic Patients*. Diabetes Care January 2009 32 (1):147-152
87. Wittenburg H: *Hereditary liver disease: Gallstones*. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology 2010;24(5):747-756.
88. Méndez-Sánchez N¹, Chavez-Tapia NC, Motola-Kuba D, Sanchez-Lara K, Ponciano-Rodríguez G, Baptista H, Ramos MH, Uribe M: *Metabolic syndrome as a risk factor for gallstone disease*. World J Gastroenterol 2005;11(11):1653-1657.
89. Wang SN, Yeh YT, Yu ML, Wang CL, Lee KT: *Serum adiponectin levels in cholesterol and pigment cholelithiasis*. Br J Surg 2006;93(8):981-986.

5. Anlagen

5.1 Erklärung über den wissenschaftlichen Beitrag des Promovenden zur Publikation

Titel: Serum adiponectin and progranulin levels are associated with gallstone disease

Autoren: Jana Breitfeld*, Ruth Sandvoß*, Dorit Schleinitz, Yvonne Böttcher, Mathias Faßhauer, Matthias Blüher, Michael Stumvoll, Peter Kovacs, Henning Wittenburg, Anke Tönjes

(*geteilte Erstautorenschaft)

Journal: Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes

Erklärung:

Ruth Sandvoß erarbeitete ausgehend von den vorliegenden Daten von PD Dr. Anke Tönjes zusammen mit Dr. Jana Breitfeld die Fragestellung und das methodische Vorgehen der Publikation. Anschließend bereitete sie eigenständig die Rohdaten für die Analyse auf und führte die statistischen Berechnungen durch. Gemeinsam mit PD Dr. Anke Tönjes, Dr. Dorit Schleinitz, Dr. Yvonne Böttcher, Prof. Mathias Faßhauer, Prof. Matthias Blüher, Prof. Michael Stumvoll, Prof. Peter Kovacs, Prof. Henning Wittenburg und Dr. Jana Breitfeld diskutierte sie die Ergebnisse ihrer Analysen. Außerdem fertigte sie nach einer ausführlichen Literaturrecherche einen ersten Entwurf des Publikationsmanuskripts an, welcher durch PD Dr. Anke Tönjes, Prof. Peter Kovacs, Dr. Jana Breitfeld und Prof. Henning Wittenburg editiert wurde.


PD Dr. Anke Tönjes


Dr. Jana Breitfeld


Prof. Dr. Peter Kovacs


PD Dr. Henning Wittenburg


Prof. Dr. Mathias Fasshauer


Dr. Yvonne Böttcher


Dr. Dorit Schleinitz


Prof. Dr. Matthias Blüher


Prof. Dr. Michael Stumvoll


Ruth Sandvoß

5.2 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

Datum

Unterschrift

5.3 Lebenslauf

Name:	Ruth Sandvoß, geb. Völkl	
Anschrift:	Bayernstraße 29 91161 Hilpoltstein	
Geburtsdatum:	12.02.1977	
Geburtsort:	Eichstätt	
Nationalität:	deutsch	
Familienstand:	verheiratet	
Schulischer Werdegang:	1983-1987	Grundschule
	1987-1996	Gymnasium Gunzenhausen und Hilpoltstein
	06/1996	Abitur
Vorbereitung auf das Studium:	10/1996 - 09/1997	Freiwilliges Soziales Jahr im Seniorenheim Kieferngarten, München
	10/1997 - 04/1998	Arbeit im Pflegeheim Petersgmünd als Pflegehelferin
	05/1998 - 09/1998	Auslandsaufenthalt in Florenz/Italien
Medizinstudium:	10/1998 – 09/2000	Vorklinischer Studienabschnitt, Universität Magdeburg
	09/2000	Ärztliche Vorprüfung
	10/2000 – 04/2005	Klinischer Studienabschnitt, Universität Leipzig
	08/2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	03/2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	04/2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	08/2005	Approbation als Ärztin
	11/2005 - 09/2010	Weiterbildungsassistentin in der Abteilung für Innere Medizin, Krankenhaus Eilenburg
Berufliche Tätigkeit:	10/2010 - 05/2012	Elternzeit
	seit 06/2012	Weiterbildungsassistentin in der Praxis für Allgemeinmedizin Dr. Christiane Krug, Hilpoltstein

5.4 Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an Frau PD Dr. Anke Tönjes für die Überlassung des Themas und für alle Hilfestellungen und kompetenten Ratschläge während aller Phasen der Entstehung dieser Arbeit.

Ein großes Dankeschön geht an Frau Dr. Jana Breinfeld. Für deine Nachhilfe in Statistik, dafür dass wir auch über die Entfernung immer guten Kontakt hatten und du dich – selbst bei Kleinigkeiten - immer zuständig gefühlt hast. Danke für deinen langen Atem!!

Für den stetigen Rückhalt, die Unterstützung und die motivierenden Worte (auch wenn diese mich manchmal den letzten Nerv gekostet haben...) danke ich meinem Mann Torsten von Herzen.

Meinen Kindern David, Raphael und Elisabeth danke ich für ihre Geduld und den Verzicht, den sie wegen mir erdulden mussten. Ihr zeigt mir immer wieder, dass das Glück direkt vor meinen Füßen liegt.

Ein aufrichtiger Dank geht an meine Familie, an Mama, Papa, Erich, Doris und Paul. Ohne eure langjährige Unterstützung und euren pausenlosen Rückhalt wäre ich nicht dort, wo ich jetzt bin!

Ich danke allen, die mit Gedanken, Worten und Taten an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren.